基于 PI3K/Akt/mTOR 信号通路调控肺泡巨噬细胞自噬探讨银杏叶提取物防治 COPD 的机制

10.12114/j.issn.1007-9572.2022.0558

郭栋伟[1]，张鹏飞[1]*，任明君[2]，廖丽君[1]，黄茹妍[2]，罗湘蓉[2]

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81904111）；广西自然科学基金资助项目（2020GXNSFBA297022）

1.545000 广西壮族自治区柳州市，柳州市中医医院（柳州市壮医医院）呼吸与危重症医学科

2.530200 广西壮族自治区南宁市，广西中医药大学

*通信作者：张鹏飞，主治医师；E-mail:2452506129@qq.com

【摘要】**目的** 探讨银杏叶提取物（Ginkgo biloba extract, GBE）通过磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K) /蛋白激酶 B(Akt) /哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路调控肺泡巨噬细胞自噬防治慢性阻塞性肺疾病（chronic obstructive pulmonary disease, COPD）的作用机制。**方法** 将 90 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠随机分为正常对照组、COPD 模型组、GBE 组、康士得组、雷帕霉素组、Taselisib 组，每组各 15 只，除正常对照组外，其余各组采用香烟熏吸联合气管内注入脂多糖（LPS）的方法构建 COPD 大鼠模型，GBE 组于实验的第 15d-28d 腹腔注射舒血宁注射液，其余各组于实验的第 29d-42d 分别予 Akt 抑制剂康士得、mTOR 抑制剂雷帕霉素、PI3K 抑制剂 Taselisib 干预；显微镜下计数各组大鼠肺泡巨噬细胞数量，HE 染色观察各组大鼠肺泡病理改变及气道重塑情况，透射电镜观察各组大鼠肺泡巨噬细胞的超微结构，酶联免疫吸附法（ELISA）检测大鼠肺泡灌洗液（BALF）与血清白细胞介素-6（IL-6）和白细胞介素-8（IL-8）水平；蛋白免疫印迹法（WB）检测各组大鼠肺泡巨噬细胞 PI3K p110a、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3 II/LC3I 蛋白表达水平。**结果** GBE 组和各抑制剂组肺泡巨噬细胞数量明显小于 COPD 模型组（$P<0.05$）；GBE 组和各抑制剂组的肺泡平均内衬间隔(MLI)与平均肺泡面积 (MAA)明显小于 COPD 模型组，而平均肺泡数(MAN)明显大于 COPD 模型组（$P<0.05$）；与 COPD 模型组相比 GBE 组与各抑制剂组大鼠支气管壁结构基本完整，纤毛排列较整齐，支气管管壁及其周围炎症细胞浸润较少；透射电镜观察发现 GBE 组与各抑制剂组肺泡巨噬细胞的自噬溶酶体较 COPD 模型组明显增多；与 COPD 模型组相比，GBE 组与各抑制剂组 BALF 与血清中 IL-6、IL-8 含量明显降低（$P<0.05$），PI3K p110a、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白表达水平明显降低（$P<0.05$），而 LC3-II/LC3I 的比值明显升高（$P<0.05$）。**结论** GBE 能通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，维持 COPD 大鼠肺泡巨噬细

胞的自噬功能，减轻巨噬细胞浸润，抑制炎症反应、肺泡破坏，改善气道重塑。
【关键词】慢性阻塞性肺疾病；银杏叶提取物；PI3K/Akt/mTOR 信号通路；肺泡巨噬细胞；自噬
【中图分类号】R563.3　【文献标志码】A

Regulation of alveolar macrophage autophagy based on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway to explore the mechanism of Ginkgo biloba extract in preventing and treating COPD

GUO Dong-wei[1],ZHANG Peng-fei[1],REN Ming-jun[2],LIAO Li-jun[1],HUANG Ru-yan[2], LUO Xiang-rong[2]*
1.Department of Respiratory Critical Care Medicine,Liuzhou Traditional Chinese Medical Hospital,Liuzhou 545000,China
2.Guangxi University of Traditional Chinese Medicine,Nanning 530200,China
**Corresponding author：ZHANG Peng-fei,*attending physician;*E-mail:2452506129@qq.com*

Abstract：Objective To explore the mechanism of ginkgo biloba extract regulating alveolar macrophage autophagy through PI3K/Ak/mTOR signal pathway in preventing and treating chronic obstructive pulmonary disease.**Methods** Ninety SPF male Wistar rats were randomly divided into normal control group, COPD model group, GBE group, Kangshide group, rapamycin group and Taselisib group, with 15 rats in each group. Except for the blank group, the other groups were treated with incense and smoke combined with intratracheal injection of lipopolysaccharide (LPS) to establish COPD rat models. Shuxuening injection was injected intraperitoneally in GBE group on the 15th to 28th day of the experiment. The rest of the groups were intervened by Akt inhibitor Constance, mTOR inhibitor rapamycin and PI3K inhibitor Taselisib on the 29th-42nd day of the experiment. The number of alveolar macrophages in each group was counted under microscope, the pathological changes and airway remodeling of alveoli in each group were observed by HE staining, the ultrastructure of alveolar macrophages in each group was observed by transmission electron microscope, and the levels of alveolar lavage fluid (BALF) and serum interleukin -6(IL-6) and interleukin -8(IL-8) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Western blotting (WB) was used to detect the expression levels of PI3K p110a、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR、LC3 II/LC3I proteins in alveolar macrophages of rats in each group.**Results** The number of alveolar macrophages in GBE group and inhibitor group was significantly less than that in

COPD model group ($P < 0.05$). The mean alveolar lining interval (MLI) and mean alveolar area (MAA) of GBE group and inhibitor groups were significantly smaller than those of COPD model group, while the mean alveolar number (MAN) was significantly larger than that of COPD model group ($P<0.05$). Compared with COPD model group, the structure of bronchial wall of rats in GBE group and inhibitor groups is basically complete, cilia are arranged neatly, and inflammatory cells infiltration in bronchial wall and its surroundings is less. Transmission electron microscopy showed that the autophagic lysosomes of alveolar macrophages in GBE group and inhibitor group were significantly more than those in COPD model group. Compared with COPD model group, the contents of IL-6 and IL-8 in BALF and serum of GBE group and inhibitor groups were significantly decreased ($P<0.05$), the expression levels of PI3K p110a、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR protein were significantly decreased ($P<0.05$), While the ratio of LC3-II/LC3I increased significantly ($P<0.05$).**Conclusion** GBE can regulate PI3K/Akt/mTOR signaling pathway, maintain the autophagy function of alveolar macrophages in COPD rats to reduce macrophage infiltration,inhibit inflammatory reaction and alveolar destruction, and improve airway remodeling.

【Keywords】Chronic obstructive pulmonary disease; Ginkgo biloba extract; PI3K/Akt/mTOR signal path; Pulmonary alveolar macrophages; Autophagy

COPD 是一种常见的慢性呼吸系统疾病，疾病负担严重，根据世界卫生组织(WHO)预测到 2030 年 COPD 将成为人类第三大死亡原因[1]。COPD 发病机制主要包括慢性气道炎症、氧化-抗氧化失衡、蛋白酶-抗蛋白酶失衡及免疫相关机制[2]，其中巨噬细胞参与免疫相关的调节，通过释放促炎介质，包括趋化因子、细胞因子、蛋白酶等，在协调 COPD 的炎症过程中发挥重要作用[3]，在 COPD 中，肺巨噬细胞的数量增加与功能受损是其发病的重要机理[4]。自噬是细胞通过自噬溶酶体溶解细胞内受损的蛋白质、细胞器以及入侵的病原体等来维持细胞稳态的一种重要的分解代谢过程[5]，为细胞修复、再生及延续提供条件。自噬在维持肺部炎症反应系统的正常功能和 COPD 的病情进展中起着至关重要的作用[6]。吸烟是 COPD 的首要发病因素，研究发现[7]吸烟者的肺泡巨噬细胞存在自噬功能缺陷，吸烟者的肺泡巨噬细胞内出现自噬体的异常蓄积，从而导致自噬体成熟障碍，最终引起蛋白质聚集清除受损，线粒体功能失调，以及细菌向溶酶体的传递缺陷。如何抑制巨噬细胞释放促炎因子，改善 COPD 中肺巨噬细胞自噬缺陷已逐渐成为防治 COPD 的新热点。

PI3K/AKT/mTOR 通路是细胞内最重要的信号传导途径之一，参与调控细胞生长、增殖、分化、自噬和凋亡等[8]，在细胞自噬中更是发挥关键作用[9]。GBE 是从银杏的干燥叶中提取而来的以黄酮类、萜类内酯为主要活性成分的混合物，具有改善循环、抗血小板聚集、清除自由基、抗氧化等主要药理作用[10]，临床上被广泛应用于治疗心脑血管疾病，近年来有关 GBE 治疗 COPD 的报道日益增多。梁炜等[11]研究发现 GBE 可抑制 COPD 大鼠气道和全身炎症反应，且早期干预效果更好，谭玉萍等[12]发现 GBE 能在一定程度上改善 COPD 大鼠气道重塑及肺血管重塑情况，但 GBE 治疗 COPD 的具体作用机制尚不清楚。本次研究旨在验证 GBE 能否通过调控 PI3K/AKT/mTOR 信号通路促进巨噬细胞自噬起到防治 COPD 的作用，为 GBE 在 COPD 的防治中提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组　7 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 90 只，体质量（200±20g），由长沙市天勤生物技术有限公司提供，许可证号：SCXK(湘)2019-0013，实验前 1 周将大鼠置于实验环境中饲养，室温 25-28℃，空气流通好，颗粒麦麸喂养。饲养笼具、饲料、饮水、垫料均按照 SPF 级实验动物的要求进行制备与消毒。按照随机数字表法随机分为正常对照组、COPD 模型组、GBE 组、康士得组、雷帕霉素组、Taselisib 组，每组 15 只。本实验由广西中医药大学实验动物福利伦理委员会批准（批准编号：DW20220615-063）

1.2 主要药物、试剂与仪器　银杏叶提取物选用舒血宁注射液(规格 5ml×1 支，折合银杏叶提取物 17.5mg，含总黄酮醇苷 4.2mg，银杏内酯 0.70mg)购自河北神威药业集团有限公司（国药准字 Z13020795），康士得购自爱必信（上海）生物科技有限公司（货号 ABS817935），雷帕霉素购自大连美仑生物技术有限公司（货号：MB1197），Taselisib 购自美国 MCE 公司（货号：HY-13898），云烟过滤嘴香烟（红云红河烟草有限责任公司，焦油量 10mg、烟气烟碱量 1.1mg，烟气一氧化碳含量 12mg），LPS 购自美国 Sigma 公司(货号：L2880)，IL-6（货号：R201203-003a）、IL-8(货号：R201127-008a) ELISA 试剂盒购自深圳市欣博盛生物科技有限公司，PI3K p110α（货号：C73F8）、Akt（货号：C67E7）、p-Akt（货号：Ser473）、mTOR（货号：7C10）、p-mTOR（货号：Ser2448）、LC3A/B（货号：D3U4C）均购自美国 CST 公司，CD68(货号：bs-0649R）购自北京博奥森生物技术有限公司；倒置显微镜（MI52-N，广东明美），超低温冰箱（705，美国 THERMO），倒置荧光显微镜(DMIL LED，德国 LEICA 公司)，酶联免疫检测仪（DG5033A，南京华东），冰冻切片机（CM1850 德国 LAICA），全自动化学发光分析仪采用（Tanon-5200，上海天能），透射电镜（HT7700，日立）。

1.3 造模方法与结果判定　采用香烟烟雾熏吸联合气管内注入 LPS 构建 COPD 大鼠模型[13]，除正常对照组外其余各组在造模的第 1d、第 14d 将大鼠以 10%水合氯醛（3ml/kg）以腹腔注射麻醉后，将大鼠固定，暴露喉头，向大鼠气管内注入 LPS100ul/100g(1mg/ml)，完毕后将大鼠直立旋转 10～20s，使 LPS 均匀分布于肺部，于实验的第 2～13d、15～28d，每天在自制烟熏箱 （120cm×80cm×80cm，含 1 个进烟孔，2 个排烟孔）中对大鼠进行香烟烟雾暴露，持续吸入新鲜的香烟雾 1h/d，30 支/d，造模 28d 结束；正常对照组于第 1d、第 14d 向气管内注入生理盐水（NS）100ul/100g ，其余时间均进行正常饲养。造模过程中，因麻醉意外和香烟烟雾熏吸致使正常对照组、GBE 组、康士得组、雷帕霉素组各死亡 1 只，COPD 模型组和 Taselisib 组各死亡 2 只，造模结束后，每组大鼠随机处死 2 只进行肺组织病理检测；实验 28d 后，正常对照组大鼠进食、活动均正常，呼吸顺畅，大鼠肺泡壁完整、泡腔无扩大，支气管结构正常、形态清晰、纤毛排列整齐，血管腔无狭窄、血管壁无增厚，其余各造模组大鼠出现进食减少、蜷伏少动、毛发枯黄易脱落、气道有痰鸣音表现，大鼠肺组织病理表现为肺泡壁断裂融合形成肺大泡、肺气肿明显、气道管壁增厚、气道管腔狭窄、血管壁增厚、血管腔狭窄、炎性细胞浸润明显，判定造模成功。

1.4 分组给药　于实验的第 15d-28d，GBE 组采用舒血宁注射液腹腔注射，用药量为 0.4ml/kg/d，其余各组均采用腹腔注射同等体积的 NS 做对照；于实验第 29d-42d，采用由 DMSO、聚乙二醇、吐温 80、生理盐水配制的混合溶剂溶解康士得、雷帕霉素与 Taselisib，康士得组按照 1.0mg/kg/d 腹腔注射给药、雷帕霉素组按照 0.5mg/kg/d 给药、Taselisib 组按照 1.5mg/kg/d 给药，其余各组均采用腹腔注射混合溶剂对照。

1.5 标本采集　全部实验结束后即第 43d，各组大鼠用 10%水合氯醛（3ml/kg）麻醉，腹主动脉采血 5ml/只，于 3000 r/min，离心 15min，留取血清分装，于-80℃冰箱保存；提取大鼠原代肺泡巨噬细胞与留取 BALF 详见 1.6；随后剖取肺脏，取距离肺门 3mm 处的右肺组织做连续切片，快速放入 4%多聚甲醛溶液中，用于后续的病理检测，余下的右肺组织经干冰速冻后转移至-80℃冰箱保存，用于后续的蛋白与 RNA 提取，取左肺组织放入电镜固定液固定，用于透射电镜检测。

1.6 大鼠原代肺泡巨噬细胞提取与 BALF 留取　参照禹茜等[14]的方法将麻醉后的大鼠用 75%酒精浸泡 30min，剪开颈部皮肤, 分离气管，在环状软骨下用剪刀做 T 字形切口，将自制气管插管由切口处插入气管内，使用缝合线固定，取 5ml 注射器去除针头，吸取含体积分数 5%青霉素-链霉素-两性霉素 B 混合溶液的冷 PBS 3mL，由气管插管口注入大鼠肺内，轻柔按摩 2 分钟后回吸，重复 5 次，可回收 BALF 约 10mL，离心（4000 r/min，离心 20min）后取上清于 -80℃冰箱保

存，应用红细胞裂解液去除红细胞，用无血清 RPMI 1640 培养液重悬计数，种入细胞培养瓶中，置于细胞培养箱中培养 3h 后换液，用传统贴壁法进一步提纯细胞。

1.7 观察指标与方法

1.7.1 HE 染色观察肺组织病理改变 HE 染色：用 4%多聚甲醛固定大鼠右肺组织 48h 后，采用梯度乙醇脱水，二甲苯透明，石蜡包埋，冰冻后切片，切片厚度为 3μm，二甲苯脱蜡脱水，行 HE 染色后予中性树胶封片。采用倒置显微镜拍照，采用 Image- pro-plus6.0 图像分析软件进行分析测算。肺泡病理改变：在每只大鼠的 HE 染色切片中选取 5 个不同视野，200 倍镜下观察、记录、分析肺泡的病理改变，观察肺平均内衬间隔(MLI)：以每个视野的正中为中心划“十”字线，计数经此十字线的肺泡间隔总数(Ns)，计算十字线总长度(L)，以 MLI= L/Ns 为肺平均内衬间隔，其值反映肺泡平均直径；平均肺泡数(MAN)：计数每个视野内的肺泡总数 (Na)，除以此视野的面积（TA），MAN=Na/TA，其值反映肺泡的密度；平均肺泡面积 (MAA)：以 HE 染色阳性区域的面积为 PA，MAA=(TA-PA)/Na。显微镜下观察各组大鼠支气管的结构、形态，纤毛排列以及炎症细胞浸润情况。

1.7.2 ELISA 检测各组大鼠 BALF 与血清中的炎症因子水平 采用 ELISA 检测大鼠 BALF 与血清中 IL-6、IL-8 的含量，具体操作按照试剂盒说明书进行。

1.7.3 各组大鼠肺泡巨噬细胞数量的比较 由于各组大鼠间体重存在一定差异，因此采用单位重量肺组织肺泡巨噬细胞的收集量来比较各组大鼠肺泡巨噬细胞数量差异；将各组大鼠所有分离纯化后的肺泡巨噬细胞使用胰蛋白酶消化后，收集于 15ml 离心管中，离心（2000 r/min，离心 10min）后吸除上清，后各加入 3ml RPMI 1640 培养液重悬，使用细胞计数板在显微镜下计算每只大鼠的肺泡巨噬细胞数。

1.7.4 透射电镜观察大鼠肺泡巨噬细胞的超微结构 采用透射电镜观察大鼠肺泡巨噬细胞的超微结构，将大鼠的左肺组织取出后切成小块，快速放入新鲜的 2.5%戊二醛固定液中，在固定液中使用锋利的刀片将肺组织切成 $1mm^3$ 大小，乙醇、丙酮脱水，丙酮、环氧树脂浸透，包埋、聚合，超薄切片、做 60nm 的超薄切片，先后予醋酸铀避光染色、枸橼酸铅避光染色，于透射电镜下观察巨噬细胞内结构并拍照。

1.7.5 Western blot 检测各组大鼠肺泡巨噬细胞中 PI3K p110a、Akt、p-Ak、mTOR、p-mTOR、LC3II/LC3I 蛋白表达量 将大鼠原代肺泡巨噬细胞从培养箱中取出，吸除培养液，使用 PBS 清洗 2 遍后按照每 1×10^6 个细胞加入含有蛋白酶和磷酸酶抑制剂的裂解液 200μl，4℃充分裂解细胞，提取肺泡巨噬细胞总蛋白，用 BCA

试剂盒检测蛋白浓度，调整蛋白浓度使各组保持一致，取 20ug 总蛋白进行上样，用 SDS-PAGE 电泳分离后，湿法转膜，5%脱脂奶粉室温封闭 2h,然后加入一抗 PI3 Kinase p110a、Akt、p-Ak、mTOR、p-mTOR、LC3A/B、β-Actin，稀释比均为 1:1000，4℃过夜，PBST 洗涤 3 次，按照 1:10000 稀释 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗，与膜室温孵育 1h，用 PBST 洗涤 3 次，将膜放置在暗室中，根据用量取 ECL 发光液进行显影，采用 Image J 图像分析软件统计各条带灰度值并计算各蛋白表达水平。

1.8 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析，计量资料以($\bar{x}$±s) 表示，数据符合正态分布并方差齐，多组间比较采用单因素方差分析，并进一步用 LSD 法进行两两比较，以 P＜0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠肺泡病理改变 正常对照组大鼠肺泡结构正常连续，肺泡壁完整，泡腔无扩大，肺泡数目较多；与正常对照组相比，COPD 模型组大鼠肺泡结构杂乱，肺泡壁变薄断裂，肺泡腔扩大，肺泡间隔数量明显减少，出现较多肺大泡，肺气肿明显；GBE 组与各抑制剂组大鼠肺泡破损程度有所减轻，肺泡结构基本正常，肺大泡形成较少；COPD 模型组的 MLI 与 MAA 明显大于正常对照组（P <0.05），而 MAN 明显小于正常对照组（P <0.05）；GBE 组与各抑制剂组的 MLI 与 MAA 明显大于正常对照组（P <0.05），而明显小于 COPD 模型组（P <0.05）；GBE 组与各抑制剂组的 MAN 明显小于正常对照组（P <0.05），而明显大于 COPD 模型组（P <0.05）；GBE 组与各抑制剂组的 MLI、MAA、MAN 组间比较无差异（P >0.05）；详见图 1、表 1。

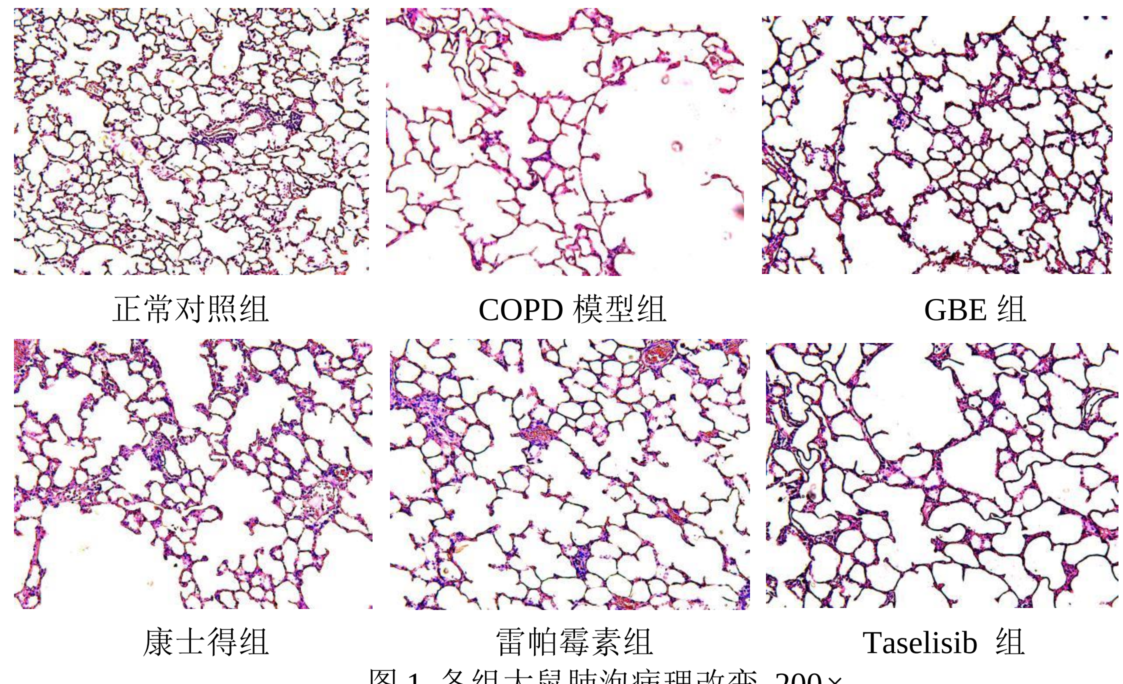


图 1 各组大鼠肺泡病理改变 200×

表 1 各组大鼠 MLI、MAN、MAA 的比较（$\bar{x}\pm s$）

组别	只数	MLI(μm)	MAN(/mm^2)	MAA（μm^2）
正常对照组	12	47.59±4.74	206.91±31.14	4573.30±789.90
COPD 模型组	11	123.01±21.94[a]	85.36±14.73[a]	11512.17±3579.00[a]
GBE 组	12	73.58±8.23[ab]	131.37±19.26[ab]	7124.91±1748.43[ab]
康士得组	12	78.16±8.54[ab]	135.78±20.68[ab]	7272.16±1450.47[ab]
雷帕霉素组	12	80.75±14.69[ab]	134.38±28.50[ab]	7879.51±2038.87[ab]
Taselisib 组	11	75.01±8.37[ab]	149.44±19.83[ab]	6720.84±1028.26[ab]
F 值		44.564	33.002	14.992
P 值		<0.001	<0.001	<0.001

注：与正常对照组比较，$^aP<0.05$；与 COPD 模型组比较，$^bP<0.05$；b 各组间比较，$P>0.05$

2.2 各组大鼠气道重塑的比较 正常对照组支气管结构正常，形态清晰，纤毛排列整齐，气道纤毛柱状上皮细胞完整，无炎症细胞浸润；COPD 模型组支气管平滑肌层增厚，部分肌层已经断裂，黏膜下及外膜见胶原纤维增生，官腔狭窄，气道黏膜上皮脱落、减少、紊乱，管壁及其周围有明显炎细胞浸润；GBE 组与各抑制剂组大鼠支气管壁结构基本完整，气道黏膜上皮结构较完整，纤毛排列相对 COPD 模型组整齐，支气管平滑肌层稍增厚，支气管管壁及其周围炎症细胞浸润较少，详见图 2。

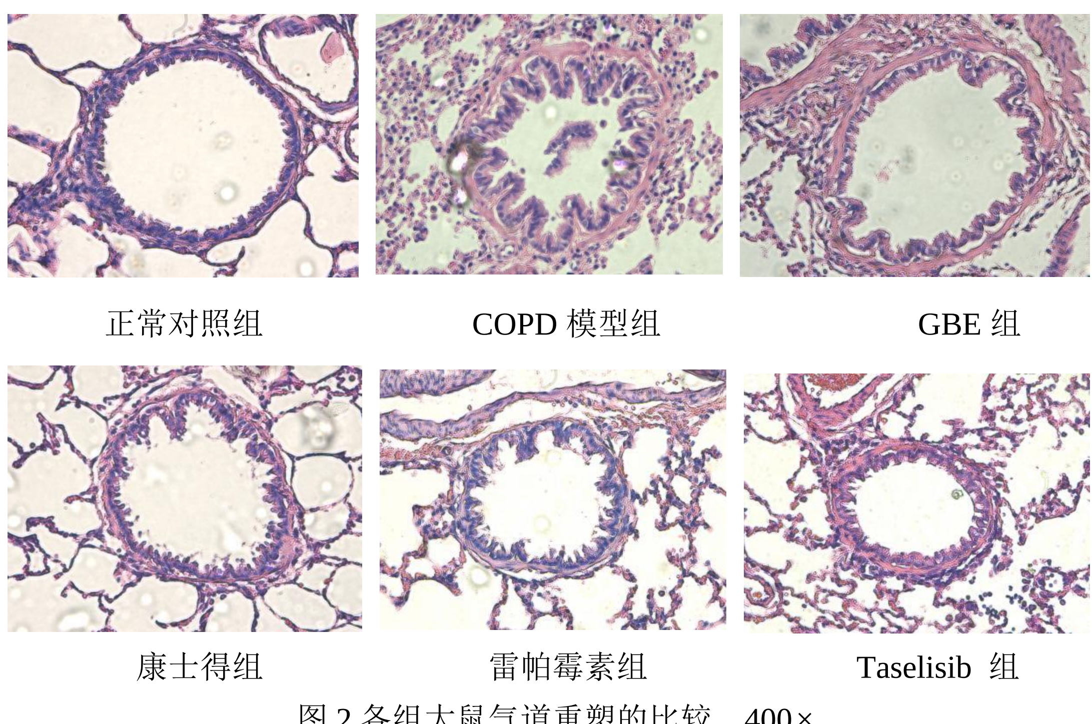


图 2 各组大鼠气道重塑的比较 400×

2.3 各组大鼠 BALF 中 IL-6、IL-8 含量的变化 在各组大鼠 BALF 中 IL-6、IL-8 含量的比较中，COPD 模型组的 IL-6、IL-8 含量明显高于正常对照组（$P<0.05$），GBE 组与各抑制剂组的 IL-6、IL-8 含量较 COPD 模型组明显降低（$P<0.05$）；

说明 GBE 与康士得、雷帕霉素、Taselisib 均能降低 COPD 大鼠 BALF 中的炎症因子，进而抑制 COPD 大鼠气道炎症反应。详见表 2。

表 2 各组大鼠肺泡灌洗液 IL-6、IL-8 含量的比较（$\bar{x}\pm s$，pg/ml）

组别	只数	IL-6	IL-8
正常对照组	12	28.52±4.10	36.29±4.41
COPD 模型组	11	243.26±13.93[a]	222.49±8.12[a]
GBE 组	12	34.39±2.01[ab]	114.98±7.38[ab]
康士得组	12	20.59±2.83[abc]	73.75±3.82[abc]
雷帕霉素组	12	28.97±4.23[bd]	101.42±7.27[abcd]
Taselisib 组	11	28.15±6.40[bcd]	75.50±3.01[abce]
F 值		1923.260	1282.215
P 值		<0.001	<0.001

注：与正常对照组比较，$^{a}P<0.05$；与 COPD 模型组比较，$^{b}P<0.05$；与 GBE 组相比，$^{c}P<0.05$；与康士得组比较，$^{d}P<0.05$；与雷帕霉素组比较，$^{e}P<0.05$。

2.4 各组大鼠血清 IL-6、IL-8 水平的变化 在各组大鼠血清中 IL-6、IL-8 含量的比较中，COPD 模型组的 IL-6、IL-8 含量明显高于正常对照组（$P<0.05$），GBE 组与各抑制剂组的 IL-6、IL-8 含量较 COPD 模型组明显降低（$P<0.05$）；说明 GBE 与康士得、雷帕霉素、Taselisib 均能降低 COPD 大鼠血清中的炎症因子，进而抑制 COPD 大鼠全身炎症反应，详见表 3。

表 3 各组大鼠血清 IL-6、IL-8 的比较（$\bar{x}\pm s$，pg/ml）

组别	只数	IL-6	IL-8
正常对照组	12	80.56±12.72	17.63±1.95
COPD 模型组	11	242.43±74.87[a]	85.79±17.19[a]
GBE 组	12	181.92±44.39[ab]	67.57±11.83[ab]
康士得组	12	137.37±18.40[abc]	45.16±2.69[abc]
雷帕霉素组	12	59.49±13.63[bcd]	65.20±4.39[abd]
Taselisib 组	11	162.26±54.13[abe]	33.68±1.68[abcde]
F 值		29.251	94.826
P 值		<0.001	<0.001

注：与正常对照组比较，$^{a}P<0.05$；与 COPD 模型组比较，$^{b}P<0.05$；与 GBE 组相比较，$^{c}P<0.05$；与康士得组比较，$^{d}P<0.05$；与雷帕霉素组相比较，$^{e}P<0.05$。

2.5 原代肺泡巨噬细胞的鉴定 CD68 是分布在细胞表面的相对分子，其在单核细胞的表面表达较少，当其向巨噬细胞转化后表达明显增加，其是巨噬细胞谱系中高度特异性表达的蛋白质，常作为鉴定巨噬细胞的特异性标志物[15,16]。将纯化后的巨噬细胞使用胰蛋白酶消化后，重悬调整细胞浓度为 2×10^{6}/ml，将 24 孔板爬片置入 24 孔板中，将巨噬细胞种于细胞爬片上，放入细胞培养箱中培养 4h 后取出，巨噬细胞已完全贴壁，先后予 PPS 浸洗、4%多聚甲醛固定、0.5%Triton

X-100 室温通透、5%山羊血清 37℃封闭、兔抗羊 CD68 一抗 4℃孵育过夜、荧光羊抗兔二抗 37℃孵育、DAPI 染核、抗荧光淬灭剂封片，使用倒置荧光显微镜观察、拍照，细胞免疫荧光显示细胞呈特异性表面标志物 C68 阳性表达，表明肺泡原代巨噬细胞的提取、纯化成功，见图 3。

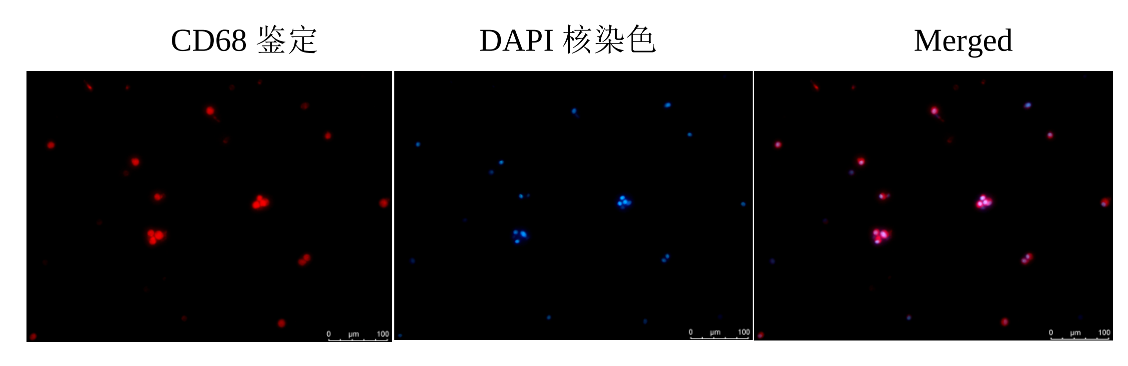


图 3　200×

2.6 各组大鼠肺泡巨噬细胞数量的比较　采用单位重量肺组织肺泡巨噬细胞的收集量来比较各组大鼠肺泡巨噬细胞数量差异；结果显示，与正常对照组比较，COPD 模型组的大鼠肺泡巨噬细胞数量明显增多($P < 0.05$)；与 COPD 模型组相比较，GBE 组与各抑制剂组大鼠肺泡巨噬细胞数量明显减少($P < 0.05$)，说明 GBE 与 PI3K/Akt/mTOR 通路抑制剂均能在一定程度上降低 COPD 大鼠肺泡巨噬细胞数量，减轻巨噬细胞异常浸润，见表 4。

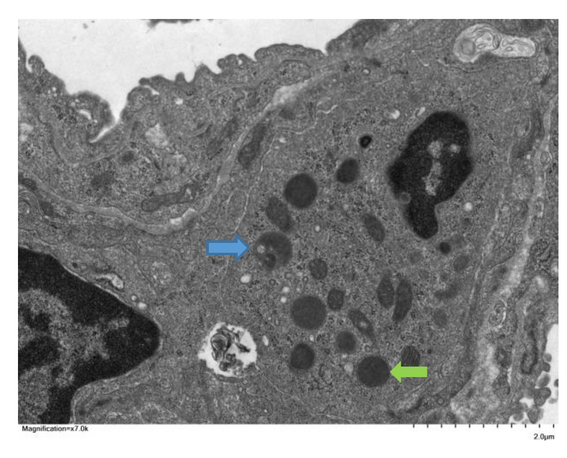
表 4 各组大鼠单位重量肺组织肺泡巨噬细胞数量的比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	肺泡巨噬细胞的收集量($\times10^6$/g 肺组织)
正常对照组	1.35±0.09
COPD 模型组	3.68 ± 0.20^{a}
GBE 组	2.51 ± 0.14^{ab}
康士得组	2.49 ± 0.11^{ab}
雷帕霉素组	2.29 ± 0.18^{ab}
Taselisib 组	2.30 ± 0.01^{ab}
F 值	87.380
P 值	<0.001

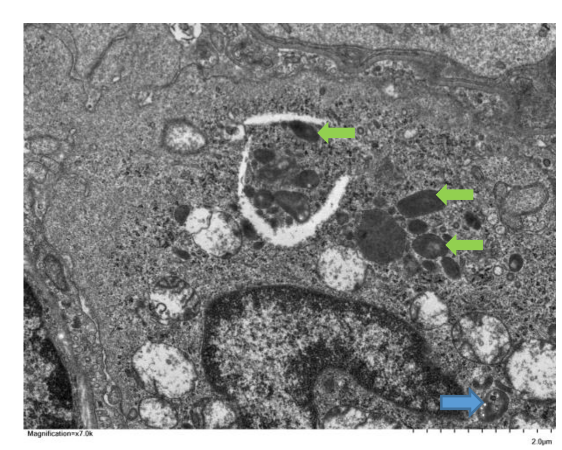
注：与正常对照组比较，$^{a}P<0.05$；与 COPD 模型组比较，$^{b}P<0.05$；b 各组间比较，$P>0.05$

2.7 透射电镜观察大鼠肺泡巨噬细胞超微结构　电镜是观测细胞自噬的金标准，从电镜图片中可以看出，肺泡巨噬细胞位于肺的基底膜空腔内侧，透射电镜下巨噬细胞多呈圆形或椭圆形，表面有凸起，细胞浆内可见数量不等的初级和次级溶

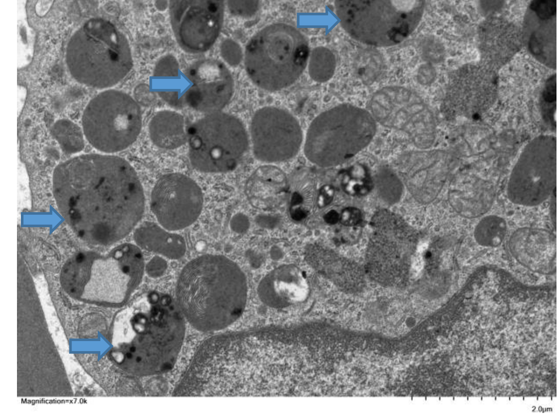
酶体或吞噬体。以下图片中绿色箭头指示的是初级溶酶体，又叫不进行活动的溶酶体，未开始消化衰老的细胞器、线粒体、糖原等物质；当细胞内退变、崩解的某些细胞器或局部细胞质由一单层界膜加以包围后形成囊泡状小体，称为自噬体，当自噬体与初级溶酶体融合后会形成次级溶酶体，又称自噬溶酶体（蓝色箭头指示），并激活水解酶分解衰老的细胞器或过量积存的糖元等物质，以实现细胞本身的代谢需要和某些细胞器的更新。由电镜结果可以看出正常对照组存在自噬行为，但自噬活动较弱，初级溶酶体与自噬溶酶体均较少；COPD 模型组自噬较正常对照组增强，但自噬溶酶体较少，而初级溶酶体增多明显；GBE 组与各抑制剂组的自噬溶酶体较 COPD 模型组明显增多，详见图 4。



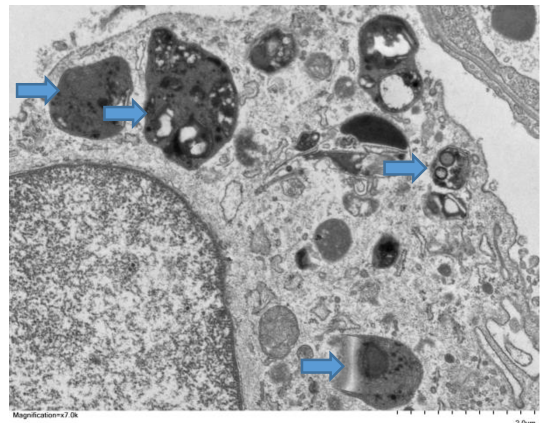
正常对照组



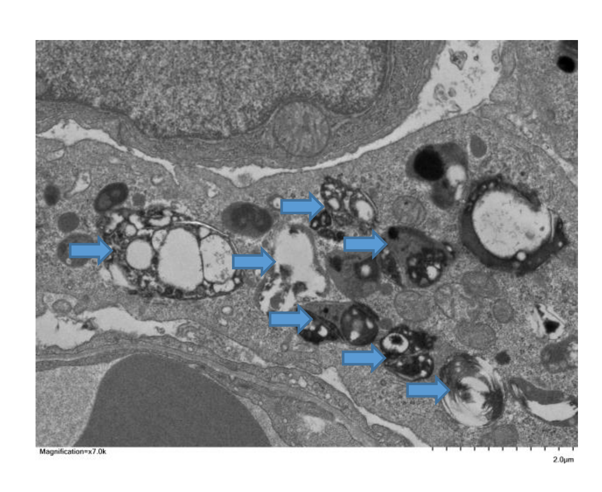
COPD 模型组

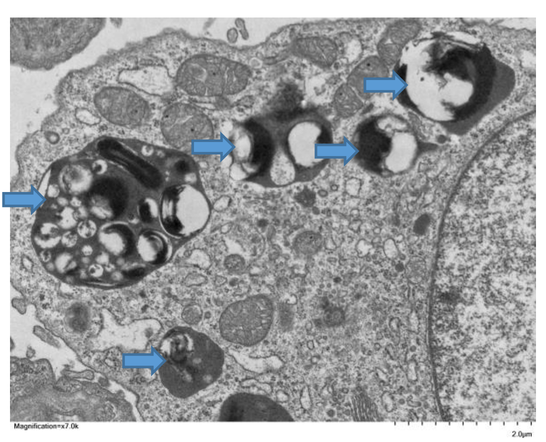


GBE 组



康士得组





雷帕霉素组　　　　　　　　　　　　Taselisib 组

图 4 各组肺泡巨噬细胞超微结构的比较 7000×

2.8 各组大鼠肺泡巨噬细胞中 PI3K p110a、Akt、p-Ak、mTOR、p-mTOR、LC3II/LC3I 蛋白表达量比较　在各组大鼠肺泡巨噬细胞 PI3K p110a、Akt、p-Ak、mTOR、p-mTOR、LC3II/LC3I 蛋白表达量的比较中，正常对照组的 PI3K p110α、Akt、p-Ak、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量明显高于 COPD 模型组、GBE 组与各通路抑制剂组，LC3II/LC3I 的比值明显低于 COPD 模型组、GBE 组与各通路抑制剂组，差异有统计学意义（P<0.05）；与 COPD 模型组相比，GBE 组与各通路抑制剂组的 PI3K p110α、Akt、p-Ak、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量明显降低（P<0.05），而 LC3II/LC3I 的比值明显增高（P<0.05），详见图 5、6、7 与表 5。

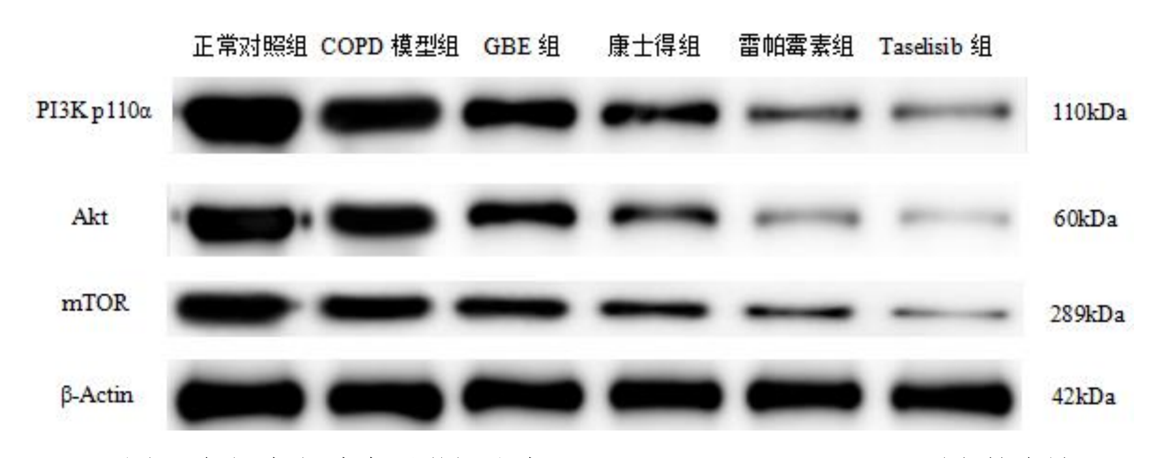


图 5 各组大鼠肺泡巨噬细胞中 PI3K p110a、Akt、mTOR 蛋白的表达



图 6 各组大鼠肺泡巨噬细胞中 p-Akt、p-mTOR 蛋白的表达

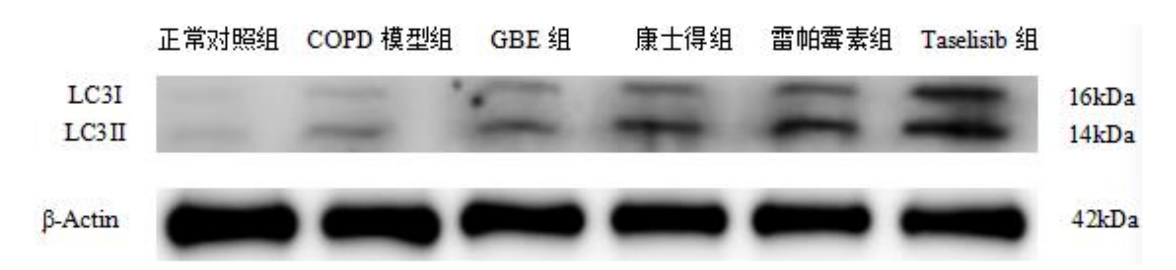


图 7 各组大鼠肺泡巨噬细胞中 LC3I、LC3II 蛋白的表达

表 5 各组大鼠肺泡巨噬细胞中自噬相关蛋白表达量的比较（$\bar{x}\pm s$，n=3）

组别	PI3K p110α	Akt	mTOR	p-Akt	p-mTOR	LC3II/LC3I
正常对照组	1.11±0.23	0.98±0.11	0.77±0.12	0.55±0.02	0.47±0.02	1.02±0.01
COPD 模型组	0.81±0.18^{a}	0.73±0.13^{a}	0.59±0.10^{a}	0.42±0.01^{a}	0.42±0.02^{a}	1.20±0.03^{a}
GBE 组	0.51 ±0.15^{ab}	0.51±0.12^{ab}	0.43±0.07^{ab}	0.23 ±0.10^{ab}	0.37±0.02^{ab}	1.38±0.07^{ab}
康士得组	0.48±0.17^{ab}	0.46±0.11^{ab}	0.37±0.09^{ab}	0.11±0.06^{ab}	0.36±0.02^{ab}	1.40±0.08^{ab}
雷帕霉素组	0.36±0.08^{ab}	0.34±0.09^{ab}	0.31±0.07^{ab}	0.20±0.09^{ab}	0.14±0.03^{abcd}	1.43±0.15^{ab}
Taselisib 组	0.24±0.09^{ab}	0.19±0.06^{abcd}	0.23±0.07^{abc}	0.22±0.11^{ab}	0.33±0.02^{abce}	1.39±0.08^{ab}
F 值	11.783	21.185	15.078	15.120	76.594	11.798
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：与正常对照组比较，$^{a}P<0.05$；与 COPD 模型组比较，$^{b}P<0.05$；与 GBE 组比较，$^{c}P<0.05$；与康士得组比较，$^{d}P<0.05$；与雷帕霉素组相比较，$^{e}P<0.05$。

3、讨论

COPD 的发病机制主要包括炎性机制、氧化应激机制、免疫学机制、蛋白酶-抗蛋白酶失衡，而炎性机制是 COPD 的关键致病机制[17]，肺泡巨噬细胞、中性粒细胞等免疫细胞在 COPD 的慢性炎症机制中发挥重要作用[18]。COPD 患者气道、肺实质、BALF 与痰液中巨噬细胞的数量明显增多，且在肺气肿肺泡壁破坏部位的浸润更加明显，而在肺实质中的巨噬细胞数量与肺气肿的严重程度成正相关[19]。 研究表明[20]，肺泡巨噬细胞是导致 COPD 患者出现机体炎症的始动细胞，它能促进炎症趋化因子、中性粒细胞的释放，介导炎症反应，参与 COPD 炎症进展。在本次研究中，COPD 造模后的大鼠肺泡巨噬细胞数量较正常对照组明显增加，且肺气肿与气道重塑明显、肺泡壁破坏严重，大鼠气道与肺组织内炎症浸润明显，血清与 BALF 中炎症因子 IL-6、IL-8 较正常对照组明显升高，表明 COPD 造模成功；与 COPD 模型组比较，GBE 组、康士得组、雷帕霉素组、Taselisib 组均能在一定程度上改善 COPD 大鼠肺气肿、肺泡壁破坏及气道重塑，并能降低血清与 BALF 中 IL-6、IL-8 的含量，考虑和 GBE 与各抑制剂组均能降低大鼠肺泡巨噬细胞数量，减轻巨噬细胞浸润有关。

自噬是广泛存在于真核细胞中的一种正常的生理降解机制，可主动清除多余、受损、衰老的蛋白质与细胞器以维持细胞稳态和细胞完整性，是维持自身生存的关键细胞修复途径之一[21,22]；正常生理状态下细胞自噬处于较低水平，而在应激情况如营养缺乏、缺氧等条件下，可使细胞自噬明显增强[23]，作为机体自我保护的一种重要机制，自噬参与多种疾病的病理生理过程，影响着疾病的发生、发展[24]。自噬在 COPD 的病理生理过程中起着关键性作用，其是一把双刃剑，既可以发挥保护作用，也可产生破坏性影响[25]。PI3K/AKT/mTOR 信号通路已被证实是调节细胞自噬的主要通路[26]，PI3K 是一种广泛存在于胞质内的磷脂酰肌醇激酶，在炎症反应、信号传导等方面发挥重要作用，根据其序列同源性和底物特异性可分为 I、II、III 类，其中 I 类 PI3K 可分为 p110α 催化亚基和 p110β 催化亚基[27]，PI3K 能够激活 AKT 参与下游信号因子的调控，Akt 分子作为 PI3K/Akt /mTOR 信号通路中的关键分子，在促进细胞增殖、侵袭和转移，抑制细胞自噬和凋亡中发挥核心作用[28]，磷酸化后的 Akt 会将信号传递给 mTOR，并通过激活泛素蛋白酶体途径参与调节自噬相关基因与下游底物，从而起到抑制自噬的作用[29]，mTOR 是细胞自噬的调控中心，同时也是细胞自噬的能量和营养状态的感受器，受包括 PI3K/ Akt 等在内的多种信号通路的调节，在调节细胞自噬中发挥关键作用[30,31]。LC3 是自噬过程中的一个标志性蛋白质，其表达的强度与自噬泡数量呈正相关[32]，自噬启动后 LC3-I 开始向 LC3-II 转化，LC3II 被认为是代表自噬作用的标志性指标，其表达量的高低在一定程度上反应了自噬体的数量和自噬的程度[33]，LC3II/LC3I与自噬小体的形成程度密切相关，是反映整个自噬水平的重要标志[34]。

我们前期研究[35,36]发现，GBE 能降低 COPD 大鼠血清与 BALF 中 IL-1、IL-8 的含量，并能够抑制 COPD 大鼠肺组织中基质金属蛋白酶－9(MMP-9)的表达，从而发挥抑制 COPD 大鼠气道与全身炎症反应，抑制肺组织重塑与肺纤维化，但其具体机制尚不清楚。Taselisib 是一种有效的选择性 PI3K 抑制剂[37]；康士得作为 Akt 的抑制剂，能抑制小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的 Akt、mTOR 蛋白的表达，增加 LC3II 蛋白[38]；雷帕霉素是一种经典的自噬激动剂，通过抑制 mTOR 来激活自噬[39]；因此，在本次研究中我们采用 Taselisib、康士得、雷帕霉素作为 GBE 能否通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路促进肺泡巨噬细胞自噬治疗 COPD 的对照药物。本研究中，与正常对照组相比，COPD 模型组肺泡巨噬细胞中 PI3K p110α、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白的表达量明显下降，而 LC3II/LC3I 的比值明显上升，说明在COPD大鼠的肺泡巨噬细胞中PI3K/Akt/mTOR信号通路被抑制，

自噬水平升高，进而引起肺泡巨噬细胞自噬增强；给予 GBE、Taselisib、康士得、雷帕霉素干预后，与 COPD 模型组相比，大鼠肺泡巨噬细胞中的 PI3K p110α、Akt、p-Akt、mTOR、p-mTOR 蛋白表达量进一步下降，LC3II/LC3I 的比值明显升高，巨噬细胞自噬增强，加速清除多余、受损、衰老的蛋白质与细胞器，保障巨噬细胞发挥正常的功能，抑制了 COPD 大鼠气道与肺实质内巨噬细胞的异常蓄积，进而减轻了巨噬细胞介导的炎症反应、肺泡破损与气道重塑。

电镜是观测细胞自噬的金标准，由本次研究中电镜结果可以看出正常对照组自噬溶酶体数量较少，自噬水平较低，COPD 模型组溶酶体数量增多，自噬被激活，但以初级溶酶体增多为主，而自噬溶酶体较少，表明自噬体和初级溶酶体存在融合障碍，致使受损的细胞器、糖原等物质溶解受阻，异常堆积，进而影响正常的细胞代谢与细胞器的更新，致使肺泡巨噬细胞自噬功能受损；GBE 组与各抑制剂组的自噬溶酶体较 COPD 模型组明显增多，能加速受损的细胞器、糖原的消化，进而促进细胞代谢与细胞器的更新，从而维持肺泡巨噬细胞发挥正常的自噬功能。研究发现，吸烟的 COPD 患者肺泡巨噬细胞中自噬囊泡的数量明显增加，但由于存在自噬体运输至溶酶体的功能障碍，致使自噬活性减弱，进而导致肺泡巨噬细胞清除功能受损，最终导致 COPD 肺气肿的发生[7]，Yuta[40]等研究发现，香烟烟雾可损伤巨噬细胞的自噬功能，造成巨噬细胞自噬体成熟缺陷和自噬体内蛋白质、细胞器等物质的异常积聚；与本次研究的结果相一致。

巨噬细胞作为机体重要的免疫效应细胞，具有十分强大的吞噬和杀伤病原体的功能，在机体的抗感染免疫中发挥至关重要的作用[41]。研究表明，COPD 患者的巨噬细胞吞噬功能低下，而香烟烟雾对巨噬细胞吞噬功能的损害更明显，可造成吞噬能力显著下降[42]，而维持巨噬细胞正常的自噬功能可以直接参与调控巨噬细胞的吞噬功能，从而使巨噬细胞能有效清除病原体[43]。在本次研究中，使用 GBE 与自噬激动剂后，PI3K/AKT/mTOR 信号通路被抑制，自噬水平增强，促进了自噬体与溶酶体的结合，自噬溶酶体的数量明显增加，加速受损的细胞器、蛋白质等物质的消化，进而促进细胞代谢与细胞器的更新，使巨噬细胞的自噬活性增强，维持了巨噬细胞的正常自噬功能，进而使巨噬细胞有效发挥其吞噬功能，清除 COPD 大鼠气道与血中的病原菌，进而发挥减轻气道与全身炎症反应的作用。

综上所述，银杏叶提取物能够通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路，促进肺泡巨噬细胞发挥正常自噬功能，起到治疗 COPD 的作用，为银杏叶提取物在 COPD 的应用提供一定实验依据。

作者贡献：郭栋伟负责实验设计、文章的构思与设计，并对文章负责；任明君、廖丽君进行动物实验与细胞实验以及实验相关指标检测；黄茹妍、罗湘蓉负

责论文检索与查重；张鹏飞组织课题实施、控制实验质量，负责论文起草、论文修订与审校，对文章整体负责。

本文无利益冲突。

参考文献：

[1]ZHANG Q,LI W,AYIDAERHAN N,et al.IP_3R attenuates oxidative stress and inflammation damage in smoking-induced COPD by promoting autophagy [J]. Journal of cellular and molecular medicine, 2021,25(13):6174-6187.DOI:10.1111/jcmm.16546.

[2]张鹏飞,廖丽君,谭玉萍.银杏叶提取物治疗慢性阻塞性肺疾病作用机制的研究进展[J].中国全科医学,2017,20(15):1906-1910.DOI:10.3969 /j. issn.1007-9572.2017.15.024.

ZHANG P F,LIAO L J,TAN Y P. Research Progress on the mechanism of Ginkgo biloba extract in the treatment of chronic obstructive pulmonary disease [J].Chinese general medicine,2017,20(15):1906-1910.DOI:10.3969 /j.issn.1007-9572.2017.15.024.

[3]D'ANNA S E,MANISCALCO M,CAPPELLO F,et al. Bacterial and viral infections and related inflammatory responses in chronic obstructive pulmonary disease[J].Annals of medicine,2021,53(1):135-150.DOI:10.1080/07853890.2020.1831050.

[4]YAMASAKI K,EEDEN S F.Lung macrophage phenotypes and functional responses: role in the pathogenesis of COPD[J]. International journal of molecular sciences, 2018, 19(2): 582.DOI:10.3390/ijms19020582.

[5]NAKAMURA S,YOSHIMORI T.Autophagy and longevity[J].Mol Cells,2018, 41(1):65-72.DOI:10.14348/molcells.2018.2333.

[6]RACANELLI A C,KIKKERS S A,CHOI A M K, et al.Autophagy and inflammation in chronic respiratory disease[J]. Autophagy,2018,14(2):221-232.DOI:10.1080/15548627.2017.1389823.

[7]MONICK M M,POWERS L S,WALTERS K, et al.Identification of an autophagy defect in smokers' alveolar macrophages[J].The Journal of Immunology, 2010, 185(9): 5425-5435.DOI:10.4049/jimmunol.1001603. Epub 2010 Oct 4.

[8]BARNES P J.Mechanisms of development of multimorbidity in the elderly[J]. European Respiratory Journal,2015,45(3):790-806.DOI:10.1183/09031936.00229714.

[9]ONORATI AV,DYCZYNSKI M,OJHA R,et al.Targeting autophagy in cancer[J]. Cancer,2018,124(16):3307-3318.DOI:10.1002/cncr.31335. Epub 2018 Apr 19.

[10]张鹏飞,廖丽君,邓祯,等.银杏叶提取物的药理作用及其临床应用研究进展[J].辽宁中医杂志,2017,44(2):426-429.DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2017.02.069.

ZHANG P F,LIAO L J,DENG Z,et al.Research Progress on pharmacological action and clinical application of Ginkgo biloba extract [J].Liaoning Journal of traditional Chinese medicine,2017,44(2):426-429.DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2017.02.069.

[11]梁炜,杨红梅,梁爱武,等.银杏叶提取物对慢性阻塞性肺疾病大鼠 CRP、TNF-α 的影响[J].实用医学杂志,2017,33(12):1936-1938.DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2017.12.010.

LIANG W,YANG H M,LIANG A W,et al.Effects of Ginkgo biloba extract on CRP and TNF in rats with chronic obstructive pulmonary disease- α Influence of [J].Journal of practical medicine,2017,33(12):1936-1938.DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2017.12.010.

[12]谭玉萍,王朝晖,姚萍,等.银杏叶提取物对慢性阻塞性肺疾病大鼠气道及肺血管重塑的影响[J].中华肺部疾病杂志(电子版),2017,10(6):662-667.DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-6902.2017.06.006.

TAN Y P,WANG Z H,YAO P,et al.Effects of Ginkgo biloba extract on airway and pulmonary vascular remodeling in rats with chronic obstructive pulmonary disease [J] .Chinese Journal of lung diseases (Electronic Edition),2017,10(6):662-667.DOI:10 .3877/ cma.j.issn.1674-6902.2017.06.006.

[13]黄文锋,陈斯宁,吴嘉冬,等.慢性阻塞性肺疾病大鼠模型的构建[J].现代医药卫生,2019,35(6):801-803.DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2019.06.001.

HUANG W F,CHEN S N,WU J D,et al.Construction of rat model of chronic obstructive pulmonary disease [J].Modern medicine and health,2019,35(6):801-803.DOI:10.3969/j.issn.1009-5519.2019.06.001.

[14]禹茜,胡军涛,赖洁,等.三种方法提取大鼠原代巨噬细胞的生物学特点比较[J].中国组织工程研究,2018,22(24):3863-3868.DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0315.

YU Q,HU J T,LAI J,et al.Comparison of biological characteristics of three methods for extracting primary rat macrophages [J].Chinese tissue engineering research,2018,22(24):3863-3868.DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0315.

[15]AZEREDO SV,BRASIL SC,ANTUNES H,et al.Distribution of macrophages and plasma cells in apical periodontitis and their relationship with clinical and image data[J].J Clin Exp Dent,2017,9(9):e1060-e1065.DOI:10.4317/jced.53758.eCollection 2017 Sep.

[16]DE ALMEIDA NF,BRASIL SC,FERREIRA DC,et al.Aging effects in the expression of macrophages in post-treatment apical periodontitis lesions[J].Spec Care Dentist,2017,37(5):230-235.DOI:10.1111/scd.12234. Epub 2017 Sep 5.
[17]PRESTI RM,FLORES SC,PALMER BE, et al. Mechanisms Underlying HIV-Associated Noninfectious Lung Disease [J].Chest,2017,152(5):1053-1060.DOI: 10.1016/j.chest.2017.04.154.
[18]WANG Y,XU J,MENG Y,et al.Role of inflammatory cells in airway remodeling in COPD [J].Int J Chron Obstruct Pulmon Dis,2018,13:3341-3348.DOI:10.2147/COPD.S176122.
[19]BARNES P J.Inflammatory mechanisms in patients with chronic obstructive pulmonary disease [J].J Allergy Clin Immunol,2016,138(1):16-27.DOI:10.1016/j.jaci.2016.05.011.
[20]DEWHURST J A,LEA S,HARDAKER E, et al. Characterisation of lung macrophage subpopulations in COPD patients and controls [J]. Sci Rep, 2017, 7(1):7143. DOI:10.1038/s41598-017-07101-2.
[21]MIZUSHIMA N,LEVINE B.Autophagy in human diseases[J].N Engl J Med, 2020,383 (16):1564-1576.DOI:10.1056/NEJMra2022774.
[22]WU X Q, LIU Z M,YU X Y,et al.Autophagy and cardiac diseases: Therapeutic potential of natural products [J]. Med Res Rev,2021,41(1):314-341.DOI:10.1002/med.21733.
[23]WANG Y,ZHANG HB. Regulation of autophagy by mTOR signaling pathway [J].Adv Exp Med Biol,2019,1206:67-83.DOI:10.1007/978-981-15-0602-4_3.
[24]LEVINE B,KROEMER G. Biological functions of autophagy genes: a disease perspective[J]. Cell, 2019, 176(1-2): 11-42.DOI:10.1016/j.cell.2018.09.048.
[25]JIANG S,SUN J,MOHAMMADTURSUN N,et al.Dual role of autophagy/mitophagy in chronic obstructive pulmonary disease[J].Pulmonary Pharmacology & Therapeutics,2019,56:116-125.DOI:10.1016/j.pupt.2019.04.002
[26]WANG H,LIU Y,WANG D,et al.The upstream pathway of mTOR-mediated autophagy in liver diseases[J].Cells,2019,8(12):1-36.DOI:10.3390/cells8121597.
[27]施诚龙,陈冲,高永军,等.PI3K/AKT/mTOR 信号通路在细胞自噬中作用及机制的研究进展[J].山东医药,2021,61(27):102-105.DOI:10.3969/j.issn.1002-266X.2021.27.027.

SHI C L,CHEN C,GAO Y J,et al.Research Progress on the role and mechanism of PI3K/Akt /mTOR signaling pathway in autophagy [J].Shandong medicine,2021, 61(27):102-105.DOI:10. 3969/j. issn.1002-266X.2021.27.027.
[28]韩长鸣,戴晓玥,段前梅,等.鲍曼不动杆菌荚膜通过抑制 PI3K/Akt /mTOR 信号通路促进鼠巨噬细胞自噬和凋亡[J].江苏大学学报(医学版),2020,30(1):1-6.DOI: 10.13312/j.issn.1671-7783.y190124.
HAN C M,DAI X Y,DUAN Q M,et al.Acinetobacter baumannii capsule promotes autophagy and apoptosis of rat macrophages by inhibiting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J].Journal of Jiangsu University (Medical Edition),2020,30(1):1-6.DOI:10. 13312/j.issn.1671-7783.y190124.
[29]JIA M, QIU H, LIN L, et al. Inhibition of PI3K/AKT/mTOR Signalling Pathway Activates Autophagy and Suppresses Peritoneal Fibrosis in the Process of Peritoneal Dialysis [J]. Frontiers in physiology, 2022,13:778479.DOI:10.3389/fphys.2022. 778479.eCollection 2022.
[30]周秀,张慧,钟小宁.哺乳动物雷帕霉素靶蛋白在慢性炎症性肺部疾病中的研究进展[J].实用医学杂志,2018,34(24): 4180-4182.DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2018. 24.040.
ZHOU X,ZHANG H,ZHONG X N.Research progress of mammalian rapamycin target protein in chronic inflammatory lung disease [J].Journal of practical medicine, 2018,34(24): 4180-4182.DOI:10.3969/j.issn.1006-5725.2018.24.040.
[31]CAO Y,QU J,LI C,YANG D,et al.Celecoxib sensitizes gastric cancer to rapamycin via inhibition of the Cbl-b-regulated PI3K/Akt pathway[J].Tumour Biol,2015,36(7):5607-5615.DOI:10.1007/s13277-015-3232-6. Epub 2015 Feb 21.
[32]AGROTIS A,PENGO N,BURDEN J J,et al.Redundancy of human ATG4 protease iso- forms in autophagy and LC3/GABARAP processing revealed in cells [J]. Autophagy, 2019, 15(6):976-997.DOI:10.1080/15548627.2019.1569925.Epub 2019 Feb 1.
[33]BUSTOS SO, DA SILVA PEREIRA GJ,DE FREITAS SAITO R,et al.Galectin-3 sensitized melanoma cell lines to vemurafenib (PLX4032) induced cell death through prevention of autophagy [J].Oncotarget,2018,9(18):14567-14579.DOI:10.18632/ oncotarget.24516.
[34] JOHANSEN T, LAMARK T. Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors[J]. J Mol Biol, 2020, 432(1):80-103.DOI:10.1016/j.jmb. 2019.07.016.

[35]谭玉萍,张鹏飞,冯玉清,等. GBE 对 COPD 大鼠血清和肺泡灌洗液中 IL-1、IL-8 含量的影响[J].中国现代医学杂志,2018,28(5):7-10.DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2018.05.002.
TAN Y P,ZHANG P F,FENG Y Q,et al.Effects of GBE on the contents of IL-1 and IL-8 in serum and alveolar lavage fluid of COPD rats [J].Chinese Journal of modern medicine,2018,28(5):7-10.DOI:10.3969/j.issn.1005-8982.2018.05.002.
[36]张鹏飞,梁炜,谭玉萍,等.银杏叶提取物对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺组织 MMP-1 及 MMP-9 表达的影响[J].辽宁中医杂志,2017,44(4):849-851.DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2017.04.060.
ZHANG P F,LIANG W,TAN Y P,et al.Effect of Ginkgo biloba extract on the expression of MMP-1 and MMP-9 in lung tissue of rats with chronic obstructive pulmonary disease [J].Liaoning Journal of traditional Chinese medicine,2017,44(4):849-851.DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2017.04.060.
[37]DENT S,CORTES J,IM Y H,et al.Phase III randomized study of taselisib or placebo with fulvestrant in estrogen receptor-positive,PIK3CA-mutant,HER2-negative, advanced breast cancer: The SANDPIPER trial[J]. Annals of Oncology, 2021,32(2): 197-207.DOI: 10.1016/j.annonc.2020.10.596.
[38]赵晶,秦合伟,李彦杰,等.血管软化丸调控 PI3K/Akt /mTOR 通路影响细胞自噬及抗动脉粥样硬化的作用机制研究[J].中华中医药学刊,2020,38(1):65-69.DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2020.01.015.
ZHAO J,QIN H W,LI Y J,et al.Study on the mechanism of vascular softening pill regulating PI3K/Akt /mTOR pathway, affecting autophagy and anti atherosclerosis[J].Chinese Journal of traditional Chinese Medicine,2020,38(1):65-69. DOI:10. 13193/j.issn.1673-7717.2020.01.015.
[39]崔晓丽,魏振,沈辉,等.雷帕霉素通过激活 LC3 介导的细胞自噬改善 ApoE4/5×FAD 小鼠的认知功能[J].中国病理生理杂志,2021,37(8):1400-1408.DOI: 10. 3969/j. issn. 1000-4718. 2021. 08. 008
CUI X L,WEI Z,SHEN H,et al.Rapamycin improves cognitive function inApoE4/5×FAD mouse by activating LC3 mediated autophagy[J].Chinese Journal of pathophysiology,2021,37(8):1400-1408.DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2021.08.008.
[40]KONO Y,COLLEY T,TO M,et al.Cigarette smoke-induced impairment of autophagy in macrophages increases galectin-8 and inflammation[J].Sci Rep, 2021,11(1):335. DOI: 10.1038/s41598-020-79848-0.

[41]呙阳,周洁,赖小宝,等.不同毒力的分枝杆菌感染促进小鼠 RAW264.7 巨噬细胞自噬及 mTOR 和 AKT 磷酸化[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(12):1057-1062. DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.009108.
GUO Y,ZHOU J,LAI X B,et al. Mycobacterium infection with different virulence promotes autophagy and mTOR and Akt phosphorylation of RAW264.7 mouse macrophages[J].2020,36(12):1057-1062.DOI:10.13423/j.cnki.cjcmi.009108.
[42]庞琪,刘晓菊,施凯,等.香烟烟雾对慢性阻塞性肺疾病患者单核细胞源性巨噬细胞吞噬功能的影响[J].中华医学杂志,2014,94(12):895-898.DOI: 10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2014.12.005.
PANG Q,LIU X J,SHI K,et al.Effect of cigarette smoke on phagocytosis of monocyte derived macrophages in patients with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chinese Journal of Medicine,2014,94(12):895-898.DOI:10.3760/cma.j.issn. 0376-2491.2014.12.005.
[43]赵红星,丁佩山,刘荣玉.吞噬及饥饿诱导巨噬细胞自噬对其吞噬功能的影响[J].安徽医科大学学报,2010,46(5):401-404.DOI:10.3969/j.issn.1000-1492.2011.05.001.
ZHAO H X,DING P S,LIU R Y.Effects of phagocytosis and starvation induced autophagy of macrophages on their phagocytic function[J].Acta Universitatis Medicinalis Anhui,2010,46(5):401-404.DOI:10.3969/j.issn.1000-1492.2011.05.001.